简报 Short Communications

棉铃虫卵内半胱氨酸蛋白酶的分离纯化、氨基酸序列分析及蛋白酶鉴定

张志宏，赵小凡*，王金星
（山东大学生命科学学院生物系，济南 250100）

摘要：采用阴离子交换层析法，从棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 卵母细胞中分离纯化到一种半胱氨酸蛋白酶，SDS-PAGE 电泳显示为一条带，分子量约为 29 kDa，原位水解电泳表明其具有蛋白水解活性。对其进行了部分氨基酸序列测定，初步确定这种蛋白酶属于半胱氨酸蛋白酶类中的组织蛋白酶 B 类。
关键词：棉铃虫；半胱氨酸蛋白酶；分离纯化；氨基酸序列；鉴定
中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2002）06-0840-04

Purification，partial amino acid sequencing and identification of a cysteine proteinase in eggs of the cotton bollworm，*Helicoverpa armigera*

ZHANG Zhi-Hong，ZHAO Xiao-Fan*，WANG Jin-Xing（Department of Biology，College of Life Science，Shandong University，Jinan 250100，China）

Abstract: A cysteine proteinase from cotton bollworm eggs was purified by anion-exchange chromatography based on previous work. The proteinase gave a single band after SDS-PAGE. The molecular mass of the purified proteinase was estimated to be 29 kDa，which showed proteolytic activity in an *in situ* hydrolysis experiment. A partial amino acid sequence was compared with that of other typical proteinases. Similarities were appreciable between the composition of the egg proteinase and cysteine proteinases，particularly cathepsin B.
Key words: *Helicoverpa armigera*；cysteinase proteinase；purification；amino acid sequence；identification

卵内蛋白酶在昆虫胚胎发育中水解卵黄蛋白，为胚胎发育提供氨基酸，对胚胎发育具有重要意义。迄今为止已对多种昆虫的卵内蛋白酶进行了研究，有蝗虫（Kuk-Meiri *et al*.，1966）、果蝇（Bowens *et al*.，1997）、家蚕（Kageyama *et al*.，1981，1990）（Yamamoto *et al*.，1994）、蚊子（Cho *et al*.，1991）和蓖麻蚕（赵小凡等，1994）等。据报道，昆虫卵内有多种蛋白酶，主要有半胱氨酸蛋白酶类和丝氨酸蛋白酶类，少数为天冬氨酸蛋白酶类。不同昆虫卵内存在不同的卵内蛋白酶类，而不同的蛋白酶性质也有所不同，不能以某种昆虫中的研究成果概括其他昆虫的情况，必须对多种昆虫进行研究，比较异同，才能找到规律。

棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 属于鳞翅目夜蛾科的昆虫，是严重危害棉花生产的害虫，每年发生 4～5 代。目前主要采用化学防治，但抗药性发展很快，给防治带来很大困难。杀灭虫卵可以减少抗性发展，是理想的防治途径。但目前的杀卵剂效果不理想，急需发展新型杀卵农药。研究棉铃虫卵内存在何种蛋白酶、蛋白酶性质、受何种因子抑制、活化调控等分子生物学过程及机理，可以为杀卵农药研制提供理论依据。关于棉铃虫卵内蛋白酶性质已有初步的研究（赵小凡等，1998），推测其卵内存在多种酶类，作用 pH 在酸性范围，对牛血红蛋白有较高的水解率。本实验室已从棉铃虫卵中分离纯化到一种蛋白酶，鉴定为半胱氨酸蛋白酶类（Zhao *et al*.，1998）。

在前人研究的基础上，本文作者分离纯化出半

基金项目：国家自然科学基金资助项目（39740024；39870095）
作者简介：张志宏，女，1977 年生，河南人，博士生，研究方向为生殖生物学，E-mail：zhangzh@panda.ioz.ac.cn
* 通讯作者 Author for correspondence，Tel.：0531-8564620；E-mail：xfzhao@sdu.edu.cn
收稿日期 Received：2001-02-19；接受日期 Accepted：2002-09-27

胱氨酸蛋白酶，并进行了氨基酸序列测定，根据测得的序列与其它蛋白酶的序列进行比较，鉴定出该蛋白酶为半胱氨酸蛋白酶类的组织蛋白酶 B。

1　材料与方法

1.1　材料

昆虫材料：棉铃虫雌性成虫采自山东临清市棉田。剖腹取出卵巢，以生理盐水洗净，－20℃保存备用。

化学试剂：DEAE-Cellulose 为 Whatman 产品；DEAE-Toyopearl 为日本 Tosoh 公司产品；牛血红蛋白购于华美公司；标准蛋白质为上海生化所产品；其余化学试剂均为分析纯产品。

1.2　方法

1.2.1　蛋白酶的分离纯化（全部过程在 4℃进行）：按 Zhao 等（1998）方法进行，略有改进，主要步骤如下：

卵母细胞中加入少量缓冲液 A（0.01 mol/L Tris－HCl pH 7.0，2 mmol/L 巯基乙醇和 1 mmol/L EDTA），于冰浴中匀浆，匀浆液 10 000 r/min 离心 15 min，沉淀中再加入缓冲液 A，调匀后再次离心，收集两次离心的上清液于大量缓冲液 A 中透析过夜。透析后的匀浆液 10 000 r/min 离心 15 min，收集上清液。由上步所得上清液直接加到经缓冲液 A 充分平衡后的 DEAE-52（2.5 cm × 70 cm）柱，以一定量的缓冲液 A 洗掉未结合的杂蛋白，最后以 250 mL 平衡液对 250 mL 0.5 mol/L 氯化钠作梯度展开，同时分步收集。合并有蛋白酶活性的主峰于缓冲液 A 中透析。透析后的样品加入经缓冲液 A 充分平衡后的 DEAE-Toyopearl（1 cm × 30 cm），然后以 100 mL 平衡液对 100 mL 0.5 mol/L 氯化钠做梯度展开，同时分步收集。

1.2.2　蛋白质含量测定：采用 Lowry 法（Lowry *et al.*，1951）测定蛋白质的含量。取 100 μL 样品溶液，加入 200 μL 1mol/L 的 NaOH，2 mL RC 液（1% 的硫酸铜溶液和 2% 酒石酸钾钠溶液等体积混合后与 2% 碳酸钠溶液按 50∶1 的比例混合而成），摇匀后室温下放置 10 min。再加入 200 μL Folin 氏试剂，立即摇振均匀，室温下放置 30 min，然后于 750 nm 处比色。

1.2.3　蛋白酶活性的检测：参照 Kageyama 和 Takahashi（1990）以及 Zhao 等（1998）的方法进行。以 1% 牛血红蛋白（溶解在 pH 3.6 0.1 mol/L 乙酸缓冲液中）作为底物，与蛋白酶混匀后置 37℃温育 1 h，经 5% TCA 终止反应，离心取上清液经 Lowry 法发色，在 750 nm 测光吸收值。一个活力单位定义为：每分钟蛋白酶与底物反应所得产物的吸光值，以 0.001 表示。

1.2.4　十二烷基硫酸钠－聚丙烯酰胺电泳（SDS－PAGE）：按 Laemmi（1970）方法进行，加样量 10～50 μg 蛋白质，15% 胶浓度，电压 100 V，电极缓冲液采用 Tris 甘氨酸系统，pH 8.6。

1.2.5　蛋白酶与底物的原位水解：按 Heussen 和 Dowdel（1980）的方法进行，基本方法与 SDS－聚丙烯酰胺不连续系统的电泳相同，区别在于分离胶中加入 1% 明胶作为蛋白酶分解的底物、上样前样品不需加热、电泳结束后在 0.25% TritonX－100 中摇晃 1 h，再于 0.5 mol/L 乙酸缓冲液（pH = 3.6）中温育 2～3 h 后用考马斯亮蓝染色，最后脱色。

1.2.6　氨基酸序列测定：采用化学裂解法测定，由德国奥斯纳布品克大学生物系微生物实验室 Schmid 博士完成。

2　结果

2.1　棉铃虫卵内蛋白酶的纯化

从 10 g 剖腹卵中纯化到 3 mg 蛋白酶，纯化过程的详细数据见表 1。

表 1　棉铃虫卵内蛋白酶纯化

Table 1　Purification of the proteinase from *H. armigera*

步骤 Steps	总蛋白（mg） Total protein	酶活性（units） Enzyme activity	酶比活（units/mg） Specific activity	产率（%） Yield
匀浆液 Homogenate	125	53	0.42	100
DEAE-纤维素 DEAE-Cellulose	21	39	1.85	73
DEAE-Toyopearl	3	24	8.00	45

匀浆液经 DEAE-Cellulose 层析，梯度洗脱后检测到一个大的活性峰（41～75 管）（图 1），电泳检测含有分子量为 29 kDa 和 30 kDa 的蛋白酶（图 1）。收集活性峰部分，经 DEAE－Toyopearl 层析可得到重叠的蛋白质峰和活性峰（图 2）。经 SDS－PAGE 检测，蛋白酶纯化产物在凝胶上呈现为均一的蛋白质带，相对分子量约为 29 kDa，原位水解时在同一位置上有一条明亮的水解带，说明它有酶活性（图 3）。

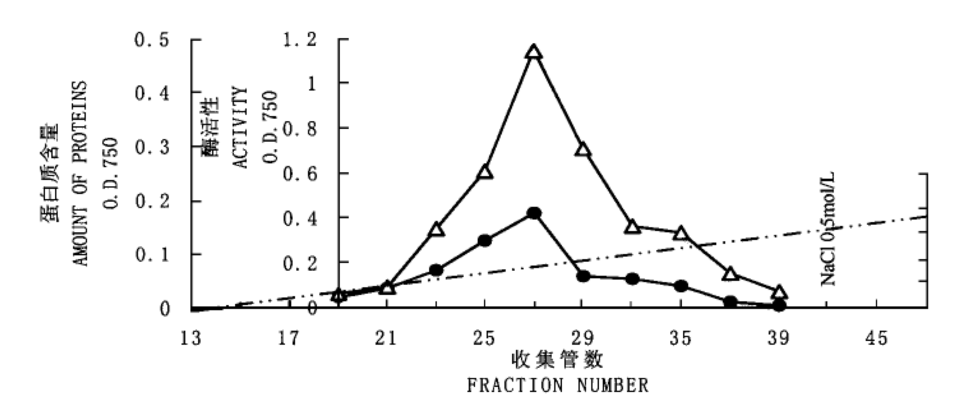


图 1 DEAE-纤维素层析（2.5 cm × 70 cm）

Fig. 1 DEAE-Cellulose（2.5 cm × 70 cm）

每管 5 mL，流速 0.3 mL/min Each fraction is 5 mL and the flow rate is 0.3 mL/min ●蛋白质含量 Quantity of proteins；△酶活性 Proteolytic activity

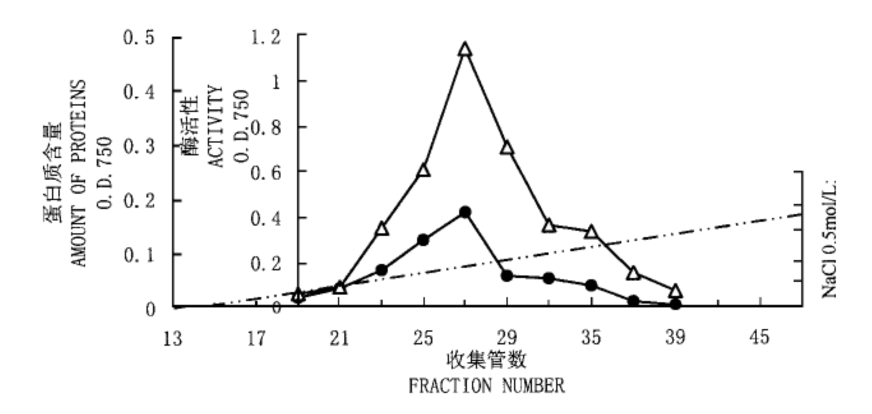


图 2 DEAE-Toyopearl 层析（1 × 30 cm）

Fig. 2 DEAE-Toyopearl（1 × 30 cm）

每管 2.5 mL，流速 0.25 mL/min Each fraction is 2.5 mL and the flow is 0.25 mL/min ●蛋白质含量 Quantity of proteins；△酶活性 Proteolytic activity

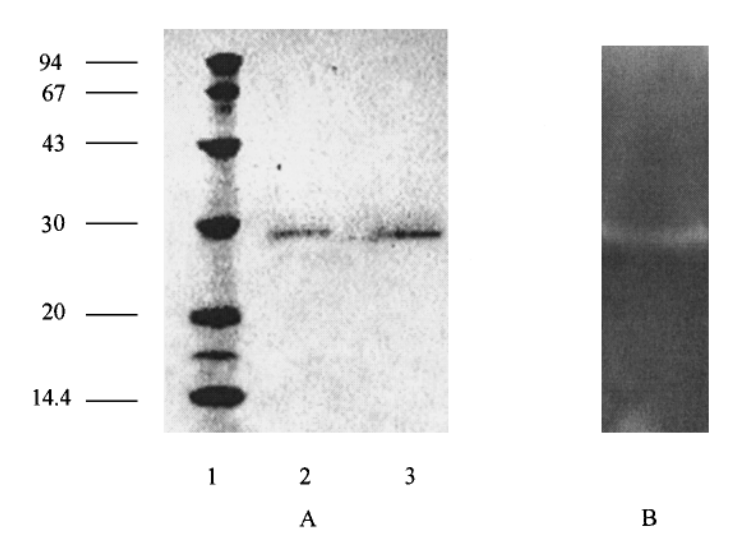


图 3 蛋白酶纯度活性及分子量检测

Fig. 3 Purity, activity and molecular mass of the proteinase

A. SDS-PAGE，15%。1. 标准蛋白质：14.4～94 kDa，分别为溶菌酶 14.4 kDa，胰蛋白酶抑制剂 20 kDa，碳酸酐酶 30 kDa，肌动蛋白 43 kDa，牛血清蛋白 67 kDa，磷酸化酶 B 94 kDa；2～3. 纯化的蛋白酶（10 μg，15 μg）。B. 原位水解电泳，15%胶浓度

A. SDS-PAGE, 15% gel concentration. Lane 1: standard proteins (Lysozyme, 14.4 kDa; Trypsin inhibitor, 20 kDa; Carbonic anhydrase, 30 kDa; Actin, 43 kDa; Bovine serum albumin, 67 kDa; Phosphatase b, 94 kDa); Lane 2－3: Purified proteinase (10 μg, 15 μg). B. *in situ* hydrolysis to show the activity of the purified proteinase

棉铃虫 COTTON BOLLWORM	1	----- ---- ---------- ---APEAFDT RDXKI----- ------ --
线虫 CAEEL	82	VNHVRLSVKG KQHLSKTKDL DLDIPESFDS RDNWPKCDSI KVIRDQSSCG
猪线虫 PIGROUNDWO	98	VNNVRLSVKA KKNLSPTRFY DIYIPEAFDA REKWDQCASL KNIRDQSSCG

图4 棉铃虫半胱氨酸蛋白酶的部分氨基酸序列与典型的组织蛋白酶B类蛋白酶的比较

Fig. 4 Comparison of partial amino acid sequence from cotton bollworm cysteine proteinase with cathepsin B

2.2 氨基酸序列分析及蛋白酶鉴定

将纯化的蛋白酶送到有关实验室测序，结果显示蛋白酶N-末端封闭，再改用裂解法使蛋白酶裂解成片段，测得一个片段的N-末端序列为：APEAFDTRDXKI。由于氨基酸数目较少，不能从基因库直接比较，因此用Expasy的Fasta分析软件进行相似性比较，结果表明此种蛋白酶与多种半胱氨酸蛋白酶类的组织蛋白酶B有相似性（图4），由此初步鉴定该酶为组织蛋白酶B类。

3 讨论

许多昆虫的卵内含有半胱氨酸蛋白酶类，例如，与棉铃虫同属鳞翅目的柞蚕（Zhao *et al.*，1996）和蓖麻蚕（赵小凡等，1994）卵内也含有组织蛋白酶B类蛋白酶，这两种蛋白酶的亚基相对分子量均为47 kDa。两种酶均以酶原形式贮存于卵母细胞内，活化机制与家蚕卵内的半胱氨酸蛋白酶明显不同。棉铃虫卵内的组织蛋白酶B的亚基相对分子量为29 kDa。这几种酶的共同点表现在作用pH均在3～5范围内，但棉铃虫卵内蛋白酶在pH 5～9也表现出一定活性，而且对高温有一定的耐受性，这使得该蛋白酶具有较好的应用前景。

另外，在第一次层析之后得到两种蛋白酶，相对分子量分别为29 kDa和30 kDa，二者在原位电泳中均出现水解带。而且多次的分离纯化过程表明二者的性质极为相近，很难分开。从其它昆虫卵内蛋白酶的性质得到启示：它们可能是同一种酶的两种不同的形式。这些有待于进一步证实。

参考文献（References）

Bowens M，Hames B D，1997. Accumulation and degradation of there major yolk proteins in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.*，220：149－156.

Cho W L，Deitsch K W，Raikhel A S，1991. An extraovarian protein accumulated in mosquito oocytes is a carboxypeptidase activated in embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA，88：10 821－10 824.

Heussen C，Dowdel E B，1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical Biochemistry*，102：196－202.

Kageyama T，Takahashi S Y，1981. Occurrence of thiol proteinase in the eggs of the silkworm，*Bombyx mori*. *J. Biochem.*（Tokyo），90：665－671.

Kageyama T，Takahashi S Y，1990. Purification and characterization of a proteinase from silkworm eggs. *Eur. J. Biochem.*，193：203－210.

Kuk-Meiri S，Lichtenstein N，Shulov A，Pener M P，1966. Cathepsin type proteolytic activity in the developing eggs of the African migratory locust（*Locusta migratoria migratorioides* R. and F.）. *Comp. Biochem. Physiol.*，18：783－795.

Laemmli U K，1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. *Nature*，227：680－685.

Lowry O H，Rosebrough N J，Farr A L，Randall R J，1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*，193：265－275.

Yamamoto Y，Takimoto K，Izumi S，Toriyama-Sakurai M，Kageyama T，Takahashi SY，1994. Molecular cloning and sequencing of cDNA that encodes cysteine proteinase in the eggs of the silkworm，*Bomyx mori*. *J. Biochem.*（Tokyo），116：1 330－1 335.

Zhao X F，Wang J X，Noriko Y，Yamamota Y，Watabe S，Takahashi S Y，1996. Occurrence of a cathepsin B-like acid cysteine proteinase in the eggs of silkworm moth *Antheraea pernyi*. *Comp. Biochem. Physiol.*，113B：95－103.

Zhao X F，Wang J X，Wang D H，1998. The Characterization of the proteinase from the eggs of the cotton bollworm，*Helicoverpa armigera*. *Acta Entomologica Sinica*，41（1）：21－25.［赵小凡，王金星，王德红，1998. 棉铃虫卵内蛋白酶性质研究. 昆虫学报，41（1）：21－25］

Zhao X F，Wang J X，Wang H F，1994. Purification and characterization of a proteinase responsible for the degradation of the vitellin in *Philosamia cynthia ricini*. Sixtieth Anniversary of the Founding of China Zoological Society Memorial Volume Dedicated to the Hundredth Anniversary of the Birthday of the Late prof. Sisan Chen（Z. CHEN）. Chinese Science and Technology Press. 146－155. ［赵小凡，王金星，王海峰，1994. 蓖麻蚕卵黄磷蛋白降解酶纯化及性质. 中国动物学会纪念陈桢教授诞辰100周年论文集. 北京：中国科学技术出版社. 146－155］

Zhao X F，Wang J X，Wang Y H，1998. Purification and characterization of a cysteine proteinase from eggs of the cotton bollworm，*Helicoverpa armigera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*，28：259－264.